

University of Groningen

Pro- and anti-fibrotic agents in liver fibrosis

Suriguga, S.

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

2019

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Suriguga, S. (2019). *Pro- and anti-fibrotic agents in liver fibrosis: Perspective from an ex vivo model of liver fibrosis*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen].

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

Summary

English Summary

Liver fibrosis is a pathological condition that is characterized by excessive deposition of extracellular matrix (ECM) proteins; if not controlled, this will finally lead to liver cirrhosis and organ failure. Liver fibrosis is considered to be initiated by the activation of hepatic stellate cells (HSCs) due to various injuries: viral, alcoholic and non-alcoholic fatty liver diseases. One of the important pathways involved in liver fibrosis is signaling through transforming growth factor- β (TGF- β). In addition, components from the gut-liver axis and oxidative stress have been identified as critical players in the development of liver fibrosis. Currently, neither the mechanism of liver fibrosis is fully understood nor has an effective anti-fibrotic strategy been developed. The work in this thesis strived to unravel the mechanism of liver fibrosis as well as to explore the possibilities of anti-fibrotic strategy using small molecules, from a perspective of human and rodent *ex vivo* model of precision-cut liver slice (PCLS).

The data obtained in this thesis is derived from both rodent and human PCLS. PCLS is a multicellular *ex vivo* model that maintains the cells and the ECM within their original texture, approximately mimicking the *in vivo* milieu. The results described in this thesis and of others have characterized the PCLS model as a suitable model to study inflammation and fibrosis in the liver. In addition, the human PCLS model can be used to obtain clinically relevant data, whereas utilizing rodent PCLS will reduce and refine the animal usage in laboratories.

First of all, in **Chapter 2**, we explored the effect of the presence of gut-microbiota on the liver inflammation induced by lipopolysaccharide (LPS) using PCLS from specific-pathogen-free (SPF) and germ-free (GF) mice. The results showed that the presence of gut-microbiota is essential for balancing the liver inflammation induced by LPS, by reducing the toxic effects of LPS. On the other hand, absence of the gut-microbiota caused a detrimental toxic inflammation in the liver by LPS. Although the gut-microbiota has been implicated to promote liver disease development in many circumstances, our results show that the positive role of gut-microbiota on dictating the liver homeostasis. Furthermore, hypersensitivity of GF rodents to certain stimuli must be considered prior to using them to study liver inflammation, fibrosis or gut-liver axis.

Subsequently, in **Chapter 3**, we compared the response of healthy and cirrhotic liver tissue to LPS using human PCLS from healthy and cirrhotic patients, aiming to understand the effect of gut derived LPS to the different stages of liver fibrosis progression. Both the healthy and cirrhotic PCLS showed a high capacity for tolerating LPS toxicity, maintaining their viability during 48h of incubation. As expected, cirrhotic livers showed a higher inflammatory and fibrotic status than healthy both before incubation and during the incubation-induced spontaneous inflammation/fibrosis. LPS induced a stronger inflammation in the cirrhotic PCLS than in the healthy. Apparently, the cirrhotic liver does not develop tolerance to LPS. However, LPS promoted the onset of fibrosis through activation of TGF- β signaling pathway only in the healthy but not in the cirrhotic PCLS. Moreover, LPS induced a higher regenerative status in cirrhotic than in healthy PCLS. Thus, LPS affected the healthy and cirrhotic PCLS differently, suggesting a divergent role of LPS during the different stages of liver fibrosis development.

In **Chapter 4**, we evaluated the anti-fibrotic potency of galunisertib, a small molecule that inhibits TGF- β receptor type I kinase, in rat and human PCLS. Galunisertib showed a promising anti-fibrotic potency, similarly in human and rat PCLS. In healthy and cirrhotic PCLS, spontaneous onset of fibrosis was inhibited by galunisertib. This small molecule modulated a broad spectrum of genes that are associated with fibrosis onset: collagens including procollagen 1 α 1, collagen maturation, non-collagenous extracellular matrix (ECM) components, ECM remodeling, and ECM receptors. Most importantly, production of procollagen I C-peptide was inhibited by galunisertib both in healthy and cirrhotic PCLS. These effects of galunisertib were due to its excellent TGF- β signaling pathway inhibitory action, indicated by blocking of phosphorylated SMAD2 (pSMAD2). Thus, galunisertib is an appraisable drug to be further evaluated in other models for treatment of liver fibrosis.

We continued to test another TGF- β signaling pathway inhibitor- LY2109761 in **Chapter 5** using *in vitro* (HepG2 cells and LX-2 cells) and *ex vivo* (human and rat PCLS) models. LY2109761 is a small molecule inhibitor of TGF- β receptor types I and II. LY2109761 inhibited pSMAD2 and procollagen 1 α 1 gene expression, blocking the spontaneous onset of fibrosis in rat and human PCLS, indicating the involvement of TGF- β signaling during this process. In addition, in these preclinical studies, LY2109761 displayed an anti-fibrotic effect: it markedly blocked gene and protein expression of collagen type 1, as well as gene expression of the inhibitor of metalloproteinases 1 in both human and rat PCLS. The mechanism of action of LY2109761 appeared to be due to both TGF- β -dependent and -independent pathways. In summary, **Chapter 4&5** illustrate that the use of small molecular inhibitors that block TGF- β signaling could be a promising strategy to mitigate fibrogenesis.

In addition to the TGF- β signaling pathway, various other signals, including oxidative stress, are involved in fibrosis development of the liver. In **Chapter 6**, we reviewed the possibilities and challenges to modulate oxidative stress for treating liver fibrosis. Reactive oxygen species (ROS) generated from the injured liver interferes with Kupffer cells, HSCs and hepatocytes to accelerate fibrosis. Currently, drugs are under development, targeting to reduce ROS generation, namely mitochondrial dysfunction inhibitors, endoplasmic reticulum stress inhibitors, NADPH oxidase (NOX) inhibitors and Toll-like receptor (TLR)-affecting agents. It is a major challenge to measure the amount of ROS generation *in vivo* as well as to sustain an appropriate amount of ROS to maintain its vital physiological function.

Collectively, this thesis provides new insight into the association of the gut-liver axis with liver fibrosis and demonstrates that the development of small molecule inhibitors of the TGF- β signaling pathway is an encouraging strategy to extenuate liver fibrosis. In addition, modulating oxidative stress, another pro-fibrogenic signal, might provide a bright future for combatting liver fibrosis. Moreover, we exhibited here a promising *ex-vivo* tool, the precision-cut liver slices, for its application in exploring mechanism of liver fibrosis as well as in anti-fibrotic drug discovery in a clinically relevant situation, thereby reducing and refining animal experiments.

Nederlandse Samenvatting

Leverfibrose is een pathologische conditie die gekarakteriseerd wordt door een overmatige vorming van littekenweefsel, dat bestaat uit extracellulaire matrix-eiwitten. Als deze vorming niet geremd kan worden, kan fibrose uiteindelijk leiden tot levercirrose en orgaanfalen. Leverfibrose wordt geïnitieerd door de activatie van hepatische stellaatcellen (HSCs). Dit kan veroorzaakt worden door verschillende insulten, zoals virussen of alcoholische en niet-alcoholische vette leverziekte. Eén van de belangrijke signaalroutes betrokken bij leverfibrose is de signalering door transforming growth factor- β (TGF- β). Daarnaast zijn componenten van de darm-lever as en oxidatieve stress geïdentificeerd als belangrijke spelers in de ontwikkeling van leverfibrose. Op dit moment is het mechanisme dat leidt tot leverfibrose nog niet volledig bekend, en is er nog geen effectieve anti-fibrotische behandeling beschikbaar. Het onderzoek beschreven in dit proefschrift was gericht op het ontrafelen van het mechanisme van fibrose, en op de anti-fibrotische activiteit van potentiële geneesmiddelen. Dit werd gedaan met de *ex vivo* humane en diermodel genaamd precision-cut leverslices (PCLS).

De data in dit proefschrift is dan ook verkregen door PCLS te vervaardigen uit leverweefsel afkomstig van knaagdieren en mensen. PCLS is een multicellulair *ex vivo* model dat de cellen behoudt in hun normale omgeving van extracellulaire matrix, waardoor het *in vivo* milieu van de lever wordt nagebootst. De resultaten die beschreven zijn in dit proefschrift, maar ook van anderen, hebben het PCLS model gekarakteriseerd als een geschikt model om ontsteking en fibrose van de lever te bestuderen. Daarnaast kan het humane PCLS model gebruikt worden om klinisch relevante data te vergaren, omdat geen extrapolatie van dier naar mens nodig is, en leidt het tot vermindering en verfijning van proefdiergebruik in laboratoria.

In **Hoofdstuk 2** werd het effect van de aanwezigheid van de darmflora op de leverontsteking, die geïnduceerd werd door lipopolysaccharide (LPS), onderzocht in PCLS van specifieke-pathogeen-vrije (SPF) en bacterie-vrije (GF) muizen. De toxiciteit van LPS was lager in PCLS van SPF muizen. Hieruit kan geconcludeerd worden dat de aanwezigheid van de darmflora essentieel is voor het beperken van de leverontsteking geïnduceerd door LPS. De darmflora wordt gezien als een belangrijke factor die ontwikkeling van leverziekten stimuleert, echter onze resultaten laten de positieve rol van darmflora zien bij het reguleren van leverhomeostase. Er moet dus rekening gehouden worden met de hypersensitiviteit van GF knaagdieren voor bepaalde stimuli, indien deze dieren gebruikt worden om leverontsteking, fibrose of de darm-lever as te bestuderen.

In **Hoofdstuk 3** werd de respons van gezond en cirrotisch leverweefsel op LPS gemeten, door gebruik te maken van PCLS afkomstig van patiënten met gezond dan wel cirrotisch leverweefsel. Het doel was om het effect van LPS op de verschillende stadia van leverfibrose te bestuderen. Zowel de gezonde als de cirrotische PCLS toonden een hoge tolerantie voor LPS toxiciteit, en bleven vitaal gedurende de incubatieperiode van 48 uur. Zoals verwacht lieten de cirrotische leverslices een hogere mate van ontsteking en fibrose zien in vergelijking met gezonde leverslices. Dit verschil was zichtbaar zowel voor als na de incubatie, daarnaast bleek dat incubatie zelf spontane inflammatie en fibrose in de PCLS induceerde. Het toevoegen van LPS leidde tot een grotere ontstekingsreactie in cirrotische PCLS ten opzichte van gezonde PCLS. Klaarblijkelijk ontwikkelt de cirrotische lever geen LPS-tolerantie. In gezond leverweefsel veroorzaakte LPS de inductie van fibrose via de activatie van de TGF- β signaaltransductie. Dit gebeurde echter niet in de cirrotische PCLS. Ook zorgde LPS voor een toename van de regeneratie in cirrotische PCLS in vergelijking met gezonde PCLS. Geconcludeerd kan worden dat LPS verschillende invloeden heeft op gezond en cirrotisch

leverweefsel; dit suggereert een verschillende rol voor LPS gedurende de verschillende stadia van de ontwikkeling van leverfibrose.

In **Hoofdstuk 4** werd de anti-fibrotische potentie van galunisertib geëvalueerd, een klein molecuul dat TGF- β receptor type I kinase remt, in humane en ratten PCLS. Galunisertib toonde een veelbelovende anti-fibrotische werking, die vergelijkbaar was in beide species. In gezonde en cirrotische PCLS remde galunisertib ook de spontane fibrotische reactie. Dit kleine molecuul moduleerde een breedspectrum aan genen die geassocieerd zijn met het beginstadium van fibrose, collagenen zoals het procollageen 1 α 1, niet-collageen extracellulaire matrix (ECM) componenten, eiwitten betrokken bij ECM hermodellering en ECM receptoren. Het belangrijkste resultaat was de remming van de productie van procollagen I C-peptide door galunisertib in zowel gezonde als cirhotische PCLS afkomstig van patiënten. Deze effecten werden veroorzaakt door de efficiënte remming van de TGF- β signaalroute door galunisertib, zoals werd aangetoond door de verminderde SMAD2 fosforylering (pSMAD2) in PCLS. Kortom, galunisertib zou een veelbelovend medicijn voor de behandeling van leverfibrose kunnen zijn, maar moet verder geëvalueerd worden in andere modellen om de toepassing als geneesmiddel bij de mens mogelijk te maken.

Dit onderzoek werd vervolgd met proeven naar een andere TGF- β signaalroute remmer genaamd LY2109761. In **Hoofdstuk 5** werden *in vitro* (HepG2 cellen en LX-2 cellen) en *ex vivo* (PCLS afkomstig van mensen en ratten) modellen gebruikt. LY2109761 is een remmer van TGF- β receptoren type I en type II. LY2109761 remde de SMAD2 fosforylering en de procollageen 1 α 1 genexpressie, wat de spontane fibrotische reactie, die normaliter in PCLS ontstaat, remde. Dit liet zien dat TGF- β signaaltransductie betrokken is bij dit proces. Ook werd er voor LY2109761 een anti-fibrotisch effect in deze preklinische studies aangetoond. LY2109761 zorgde daarnaast ook voor een aanzienlijke vermindering van de gen- en eiwitexpressie van collageen type 1, en de genexpressie van de remmer van metalloprotease 1 in PCLS. Het werkingsmechanisme van LY2109761 bleek zowel via de TGF- β -afhankelijke als de TGF- β -onafhankelijke routes te verlopen. Samengevat illustreren **Hoofdstuk 4 & 5** dat het gebruik van remmers die TGF- β signalering afremmen een veelbelovende strategie is om fibrose te behandelen.

Naast de TGF- β signaalroute zijn er verschillende andere signalen, zoals oxidatieve stress, die betrokken zijn bij de ontwikkeling van leverfibrose. In **Hoofdstuk 6** worden de mogelijkheden en uitdagingen omtrent het moduleren van oxidatieve stress voor de behandeling van leverfibrose besproken. Reactieve zuurstofmoleculen (ROS) die gevormd worden in de beschadigde lever interfereren met verschillende soorten levercellen (Kupffer cellen, HSCs en hepatocyten), en zorgen voor het versnellen van het fibroseproces. Op dit moment worden er medicijnen ontwikkeld die ROS-vorming tegen gaan. Deze medicijnen zijn remmers van mitochondriale disfunctie, NADPH oxidase (NOX) remmers, endoplasmatisch reticulum stress remmers, en agentia die aangrijpen op de Toll-like receptor (TLR). Het blijft echter een grote uitdaging om de hoeveelheid ROS vorming *in vivo* te meten en daarnaast om ROS niet volledig te remmen anders kunnen essentiële fysiologische functies van ROS verloren gaan.

Geconcludeerd kan worden dat de resultaten in dit proefschrift nieuwe inzichten hebben opgeleverd over de associatie van de darm-lever as met leverfibrose. Daarnaast lijkt het erop dat de ontwikkeling van remmers van de TGF- β signaalroute een veelbelovende strategie zou kunnen zijn om leverfibrose te behandelen. Verder zou het moduleren van de oxidatieve stress, een ander pro-fibrogeen signaal, een goed aangrijpingspunt kunnen zijn voor de toekomstige bestrijding van leverfibrose. Ook werd aangetoond dat het *ex vivo* model, de precision-cut

liverslices, uitermate geschikt is voor het bestuderen van de mechanismen van leverfibrose en de ontwikkeling van anti-fibrotische medicijnen in een klinisch relevante setting, wat uiteindelijk zal leiden tot een belangrijke vermindering en verfijning van dierexperimenten.

